

А. И. Горелов, З. Н. Нариманян, Д. С. Горелов

РОЛЬ ЭКСПРЕССИИ VIMENTIN В ОПРЕДЕЛЕНИИ ПРОГНОЗА И ТАКТИКИ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С МЕТАСТАТИЧЕСКИМ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНЫМ РАКОМ

ФБГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», медицинский факультет

Течение болезни пациентов с почечно-клеточным раком (ПКР) может быть непредсказуемым. Методом выбора лечения локализованного процесса является радикальная нефрэктомия, однако примерно у 20% больных после хирургического лечения неизбежно будет выявлена прогрессия заболевания [1, 2]. Уровень 5-летней выживаемости при первой и второй стадии ПКР составляет примерно 90–95% [3, 4]. Несмотря на это одна треть пациентов с диагнозом ПКР на момент обращения имеют отдаленные метастазы [5].

Метастатический почечно-клеточный рак (мПКР) в целом резистентен к цитотоксической химиотерапии, при этом уровни объективного ответа не превышают 10% [6, 7]. Иммуноterapia на основе интерферона приводит к повышению ответа на терапию до 20%, что было подтверждено в ряде рандомизированных исследований [8–10]. Иммуноterapia с применением высоких доз интерлейкина-2 приводит к длительному полному ответу примерно у 6% пациентов, хотя лечение связано со значительной токсичностью [11]. Но, несмотря на это, прогноз пациентов с мПКР все еще остается плохим. Однолетняя выживаемость пациентов, не получающих лечения, составляет 16% [12].

Улучшение возможностей прогнозирования выживаемости пациентов с мПКР позволит лучше стратифицировать больных и определить оптимальный объем консервативного и хирургического лечения для конкретного пациента. В 1999 г. Motzer и соавт. выявили пять факторов прогноза (статус Karnofsky, уровень лактатдегидрогеназы, гемоглобина, скорректированного кальция и наличие/отсутствие нефрэктомии в анамнезе), влияющих на выживаемость пациентов с мПКР [13]. В зависимости от наличия или отсутствия одного из факторов пациенты распределялись на 3 группы — с благоприятным, неблагоприятным и промежуточным прогнозами. Медиана выживаемости пациентов для этих трех групп составила 30, 5 и 14 месяцев соответственно [14]. Изучение экспрессии различных генов, участвующих в клеточных процессах, привело к выявлению молекулярных маркеров, определение которых может быть прогностически значимым [15, 16]. Одним из них является vimentin.

Vimentin представляет собой цитоплазматический промежуточный филамент, который характерен для мезенхимальных клеток и обычно не экспрессируется в эпителиальных клетках. Несмотря на это отмечено, что атипичная экспрессия vimentin в раковых клетках может быть связана с повышенным метастатическим потенциалом и агрессивным местным распространением. Гиперэкспрессия vimentin и взаимосвязь с метастатическим опухолевым процессом была зафиксирована при меланомах, раке молочной железы, раке шейки матки, раке простаты и почечно-клеточном раке [17–21]. Наше внимание данный молекулярный маркер привлек ввиду немногочисленно-

сти работ, посвященных значению экспрессии vimentin у пациентов с мПКР, которым проводилось хирургическое лечение.

Целью нашего исследования было определить значение влияния экспрессии молекулярного маркера vimentin на выживаемость и результаты хирургического лечения пациентов с мПКР.

Материалы и методы. В работе проанализированы истории болезней 71 пациента (50 — мужчин, 21 — женщина, в возрасте от 37 до 77 лет, средний возраст составлял $55,4 \pm 8,7$ лет), которым проводилось лечение по поводу мПКР в период с 2002 г. по 2009 г. в медицинских учреждениях города — ГМПБ № 2, ЛООД. На момент терапии все пациенты имели отдаленные метастазы. Всем больным проводилось оперативное лечение в объеме циторедуктивной нефрэктомии. По данным гистологического исследования у всех больных установлен светлоклеточный почечно-клеточный рак [22].

При распределении больных по системе TNM отмечено преобладание стадии T3 — у 46 пациентов (64,8%). Стадия T4 была выявлена у 9 (12,8%), T2 — у 8 (11,2%) и T1 — у 8 (11,2%) больных [23].

В зависимости от поражения регионарных лимфатических узлов больные распределились следующим образом: N1 — 15 (21,1%) пациентов, N2 и N0 — по 27 случаев (38%) и Nx — 2 (2,9%) больных. Степень злокачественности опухоли оценивали по классификации Фурман. Степень злокачественности G3 наблюдалась у 37 (52,1%) больных, G4 — у 19 (26,8%) и G2 — у 15 (21,1%) пациентов.

Из всех наблюдавшихся нами больных 29 пациентам после нефрэктомии в разные сроки была выполнена метастазэктомия различной локализации (метастазэктомия /резекция легких — 9, удаление надпочечника с метастазом — 7, удаление местного рецидива — 5, резекция контралатеральной почки — 1, резекция ребер — 1, плеврэктомия — 2, лимфаденэктомия (паравerteбральные / внутригрудные л. у.) — 2, резекция поджелудочной железы — 1, удаление метастаза головного мозга — 1).

Локализация метастазов представлена в таблице 1. Как следует из таблицы, наиболее часто отдаленные метастазы располагались в легких, костях и печени.

Таблица 1. Локализация метастазов

Локализация метастазов	N (количество)
Легкие	46
Кости	14
Печень	13
Надпочечник	11
Отдаленные л. у.	7
Местный рецидив	6
Плевра	5
Контралатеральная почка	2
Головной мозг	2
Поджелудочная железа	1
Диафрагма	1
Мягкие ткани	1

Синхронный характер метастазирования (наличие отдаленных метастазов на момент обращения / появление в течение 3 месяцев после радикального лечения) опреде-

лен у 57 (80,3%) больных, метасхронный (более 3 месяцев) — у 14 (19,7%). В 29 (40,9%) случаях выявлялись множественные метастазы (>5), единичные (2–5) — у 26 (36,6%), солитарные — у 16 (22,5%).

Иммуногистохимические исследования проводились на парафиновых блоках опухолей почки. На микротоме HM 340 E Rotary Microtome (Thermo Scientific, Германия) готовились парафиновые срезы толщиной 5 мкм, которые наносились на стекло, обработанное поли-L-лизином (Menzel Gmbh, Германия), и помещались в термостат при температуре 37°C на 12 ч. Срезы подвергались депарафинированию и обезвоживанию посредством последовательной инкубации в ксилоле и проводки по спиртам. Демаскировку антигенов проводили с использованием 0,01М цитратного буфера (Dako Cytomation, USA). Эндогенную пероксидазу нейтрализовали посредством помещения стекол со срезами в 5% раствор H₂O₂ в ТБС буфере (разведение 1:6 при 30% H₂O₂) в течение 15 мин. Выявление экспрессии vimentin проводили с использованием мышиных моноклональных антител к vimentin (VIM 3B4, Dako, Дания) в разведении 1:200. Экспрессия vimentin оценивалась как положительная при наличии цитоплазматического окрашивания и как отрицательная при отсутствии окрашивания [21–24].

Статистическая обработка материала проводилась с использованием пакета программ Statistica 6.0 и SPSS v.17. Для оценки чувствительности и специфичности маркера vimentin в прогнозе пациентов с мПКР был проведен ROC-анализ. В результате этого исследования была построена ROC-кривая, которая представляет собой график, на котором по оси Y определяются значения чувствительности, а по оси X — специфичности.

Результаты и обсуждение. При оценке клинико-лабораторных показателей у групп пациентов с положительной и отрицательной экспрессией vimentin установлено, что группы однородны ($p = 0,064$). Положительная экспрессия vimentin зафиксирована в 45 случаях (63,4%), отрицательная — в 26 (36,6%) (табл. 2).

Таблица 2. Экспрессия vimentin в зависимости от объема хирургического лечения

Вид лечения	Vimentin = 0	Vimentin > 0
Нефрэктомия	13	29
Нефрэктомия+метастазэктомия	13	16
Всего	26	45

При изучении риска присутствия отдаленных метастазов, установлено, что при наличии положительной экспрессии vimentin риск увеличивается в 4,6 раза (ОШ = 4,655 ДИ 1,636–13,244; $\chi^2=7,350$; $p = 0,007$).

Положительная экспрессия vimentin достоверно ассоциировалась с наличием множественных отдаленных метастазов ($\chi^2 = 7,931$; $p = 0,004$), при этом риск их наличия увеличивался в 4,8 раза (ОШ = 4,8; ДИ 1,539–14,973; $\chi^2 = 6,583$; $p = 0,01$).

При единичных и солитарных метастазах vimentin-положительная реакция не была характерна ($\chi^2 = 0,059$; $p = 0,806$).

Не отмечалась взаимосвязь уровня экспрессии vimentin и времени появления метастазов (синхронно / метасхронно) ($p = 0,588$).

В группе пациентов с отсутствием экспрессии vimentin, которым проводилась только нефрэктомия, медиана выживаемости составила 22,5 месяца, а у больных с положительной экспрессией этого маркера — 3,5 месяца. При оценке кумулятивной выживаемости данных групп пациентов в зависимости от экспрессии vimentin выявлены достоверные различия (log-rank test $p = 0,0001$). У больных, которым помимо нефрэктомии производили метастазэктомию, при отсутствии экспрессии vimentin медиана выживаемости была 36 месяцев; в vimentin-положительных случаях — 11 месяцев. Различия в кумулятивной выживаемости этих групп больных достоверны (log-rank test $p = 0,0001$).

При сравнении выживаемости пациентов с мПКР в зависимости от объема оперативного лечения (нефрэктомия / нефрэктомия+метастазэктомию) в случаях отрицательной экспрессии vimentin установлено достоверное увеличение выживаемости пациентов, перенесших нефрэктомию и метастазэктомию ($p = 0,002$) (рис. 1). Наличие же положительной экспрессии vimentin приводит к тому, что отличия в выживаемости данных групп становятся не достоверными ($p = 0,091$) (рис. 2).

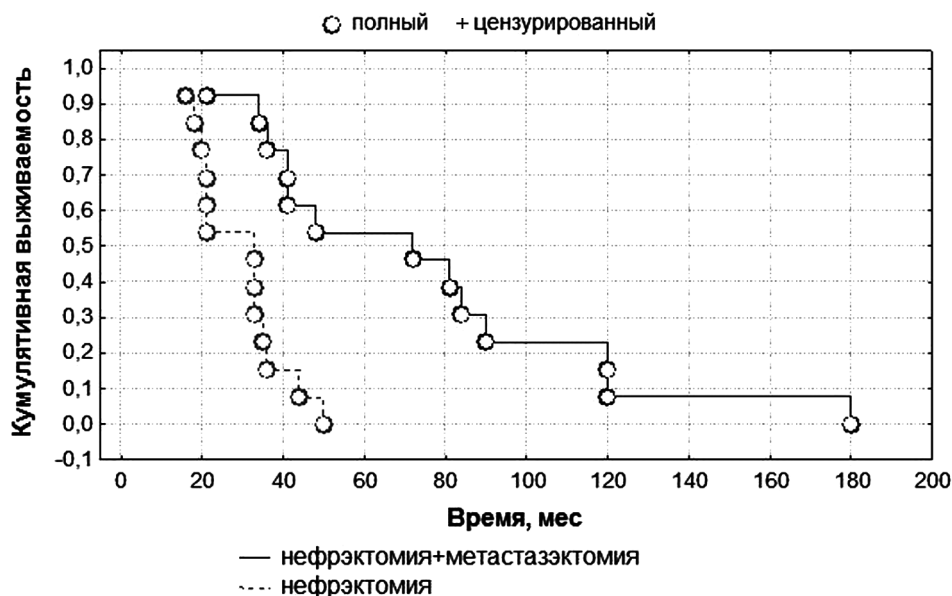


Рис. 1. Кумулятивная выживаемость в зависимости от выполнения МТСэктомии при Vimentin = 0% (метод Kaplan—Meier, log-rank test $p = 0,002$)

По результатам ROC-анализа для vimentin построена кривая зависимости чувствительности и специфичности (рис. 3). Получены статистически достоверные данные, указывающие на высокую специфичность и чувствительность данного маркера в плане прогноза пациентов с мПКР.

Положительная экспрессия vimentin приводит к снижению выживаемости пациентов с мПКР ($\chi^2 = 27,000$; $p = 0,0001$). Отрицательное влияние положительной экспрессии vimentin на выживаемость подтверждено данными параметрического корреляционного анализа для пациентов, перенесших нефрэктомию ($r = -0,5475$; $p = 0,0001$), и больных, перенесших нефрэктомию с метастазэктомией ($r = -0,4614$; $p = 0,0001$).

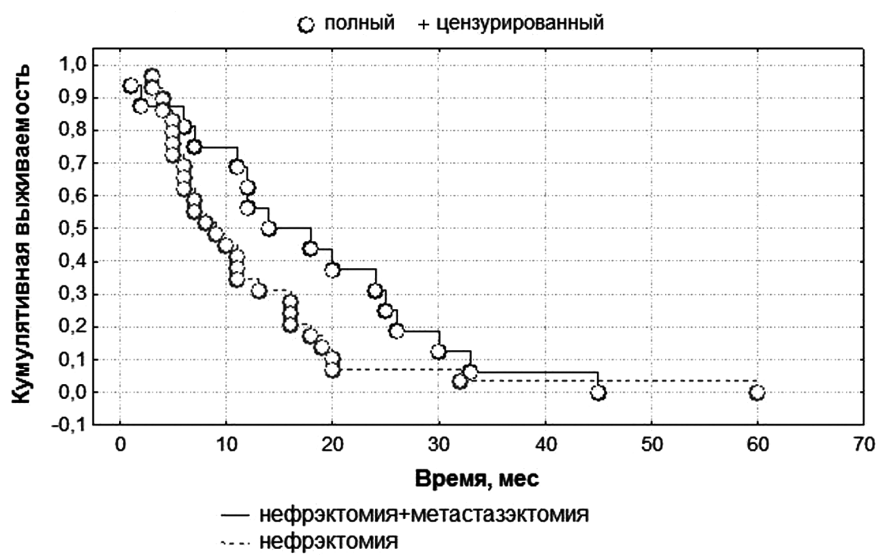


Рис. 2. Кумулятивная выживаемость в зависимости от выполнения МТСэктомии при Vimentin% > 0 (метод Kaplan—Meier, log-rank test $p = 0,091$)

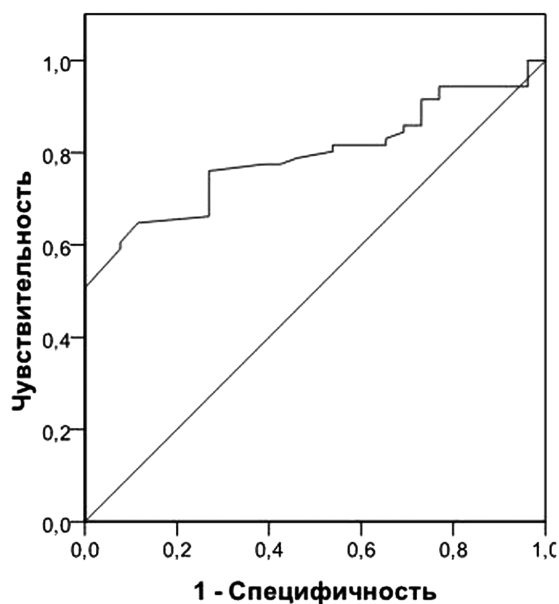


Рис. 3. Чувствительность и специфичность маркера vimentin у пациентов с мПКР (площадь под кривой — 0,791; ди — 0,705–0,878; $p = 0,044$)

В настоящее время продолжается изучение молекулярных прогностических факторов при почечно-клеточном раке, что имеет большое практическое значение в консультировании пациентов, стратификации больных по группам риска, индивидуальном подборе таргетной терапии. Одним из таких молекулярных маркеров является vimentin — цитоплазматический промежуточный филамент, который обычно не выражается в эпителиальных клетках. Vimentin обычно экспрессируется при светлоклеточном ПКР (26–51%) и папиллярном ПКР (61%) [21, 25–27].

В работе E. Sabo и соавт. изучалась значимость экспрессии vimentin при локализованном ПКР. По данным многофакторного анализа установлено, что положительная экспрессия vimentin является независимым фактором прогноза выживаемости больных ($p < 0,039$) [24]. H. Moch и соавт. показывают, что низкая общая выживаемость больных ПКР значительно коррелирует с vimentin-позитивной реакцией ($p = 0,007$) [21]. В работах Kim и соавт. изучалась прогностическая значимость различных молекулярных маркеров, в том числе и vimentin, у пациентов с мПКР, которым проводилась нефрэктомия перед иммунотерапией. По данным многофакторного анализа установлено, что vimentin является независимым предиктором опухолево-специфической выживаемости, а его включение в прогностическую модель (на основе критериев T, N, M, grade, статуса Karnofsky) приводит к повышению индекса конкордантности до $C = 0,79$ [28, 29]. В нашем исследовании установлена значимость экспрессии vimentin в прогнозе выживаемости пациентов с мПКР, которым проводилось хирургическое лечение. Отсутствие экспрессии vimentin приводит к достоверному увеличению выживаемости пациентов с мПКР, которым выполнялась нефрэктомия и нефрэктомия с метастазэктомией ($p = 0,0001$).

Определение уровня экспрессии vimentin у пациентов с мПКР позволит скорректировать прогноз. Положительная экспрессия приводит к снижению выживаемости как пациентов, перенесших нефрэктомию, так и больных после нефрэктомии с метастазэктомией. Проведение метастазэктомии после нефрэктомии оправдано в случаях отсутствия экспрессии vimentin, что позволит повысить выживаемость пациентов.

Литература

1. Vogelzang N. J., Stadler W. M. Kidney cancer // *Lancet*. 1998. Vol. 352. P. 1691–1696.
2. Kattan M. W., Reuter V., Motzer R. J. et al. A postoperative prognostic nomogram for renal cell carcinoma. *J Urol* 2001. Vol. 166. P. 63–67.
3. Guinan P. D., Vogelzang N. J., Fremgen A. M. et al. Renal cell carcinoma: tumor size, stage and survival. Members of the Cancer Incidence and End Results Committee // *J Urol*. 1995. Vol. 153. P. 901–903.
4. Figlin R. A. Renal cell carcinoma: management of advanced disease // *J Urol*. 1999. Vol. 161. P. 381–386, discussion 386–7.
5. Bukowski R. M. Natural history and therapy of metastatic renal cell carcinoma: the role of interleukin-2 // *Cancer*. 1997. Vol. 80. P. 1198–1220.
6. Yagoda A., Bander N. H. Failure of cytotoxic chemotherapy, 1983–1988, and the emerging role of monoclonal antibodies for renal cancer // *Urol Int*. 1989. Vol. 44. P. 338–345.
7. Harris D. T. Hormonal therapy and chemotherapy of renal-cell carcinoma // *Semin Oncol*. 1983. Vol. 10. P. 422–430.
8. Horoszewicz J. S., Murphy G. P. An assessment of the current use of human interferons in therapy of urological cancers // *J Urol* 1989. Vol. 142. P. 1173–1180.
9. Medical Research Council Renal Cancer Collaborators. Interferon-alpha and survival in metastatic renal carcinoma: early results of a randomised controlled trial // *Lancet*. 1999. Vol. 353. P. 14–17.

10. Pyrhonen S., Salminen E., Ruutu M. et al. Prospective randomised trial of interferon alfa-2a plus vinblastine versus vinblastine alone in patients with advanced renal cell cancer // *J Clin Oncol.* 1999. Vol. 17. P.2859–2867.
11. Rosenberg S. A., Yang J. C., White D. E., Steinberg S. M. Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response // *Ann Surg.* 1998. Vol. 228. P.307–319.
12. Patel N. P., Lavengood R. W. Renal cell carcinoma: natural history and results of treatment // *J Urol.* 1978. Vol. 119. P.722–726.
13. Motzer R. J., Mazumdar M., Bacik J. et al. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma // *J Clin Oncol.* 1999. Vol. 17. P. 2530–2540.
14. Motzer R. J., Bacik J., Murphy B. A. et al. Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma // *J Clin Oncol.* 2002. Vol. 20. P.289–296.
15. Van de Vijver M. J., He Y. D., van't Veer L. J. et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer // *N Engl J Med.* 2002. Vol. 347. P. 1999–2009.
16. Takahashi M., Sugimura J., Yang X. et al. Gene expression profiling of renal cell carcinoma and its implications in diagnosis, prognosis, and therapeutics // *Adv Cancer Res* 2003. Vol. 89. P. 157–181.
17. Ben Ze'ev A., Raz A. Relationship between the organization and synthesis of vimentin and the metastatic capability of B16 melanoma cells // *Cancer Res.* 1985. Vol. 45. P. 2632–2641.
18. Domagala W., Striker G., Szadowska A. et al. p53 protein and vimentin in invasive ductal NOS breast carcinoma-relationship with survival and sites of metastases // *Eur. J. Cancer.* 1994. Vol. 30A. P. 1527–1534.
19. Gilles C., Polette M., Piette J. et al. Vimentin expression in cervical carcinomas: association with invasive and migratory potential // *J. Pathol.* 1996. Vol. 180. P. 175–180.
20. Lang S. H., Hyde C., Reid I. N. et al. Enhanced expression of vimentin in motile prostate cell lines and in poorly differentiated and metastatic prostate carcinoma // *Prostate.* 2002. Vol. 52. P. 253–263.
21. Moch H., Schraml P., Bubendorf L. et al. High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma // *Am. J. Pathol.* 1999. Vol. 154. P. 981–986.
22. Kovacs G., Akhtar M., Beckwith B. J. et al. The Heidelberg classification of renal cell tumors // *J Pathol.* 1997. Vol. 183. P. 131–133.
23. Sobin L., Wittekind C. TNM Classification of Malignant Tumors, 6th edition. John Wiley & Sons, 2002.
24. Sabo E., Miselevich I., Bejar J. et al. The role of vimentin expression in predicting the long-term outcome of patients with localized renal cell carcinoma // *British J Urol.* 1997. Vol. 80. P. 864–868.
25. Liu L., Qian J., Singh H. et al. Immunohistochemical analysis of chromophobe renal cell carcinoma, renal oncocytoma, and clear cell carcinoma: an optimal and practical panel for differential diagnosis // *Arch Pathol Lab Med.* 2007. Vol. 131. P. 1290–1297.
26. Khoury J. D., Abrahams N. A., Levin H. S. et al. The utility of epithelial membrane antigen and vimentin in the diagnosis of chromophobe renal cell carcinoma // *Ann Diagn Pathol.* 2002. Vol. 6. P. 154–158.
27. Young A. N., Amin M. B., Moreno C. S. et al. Expression profiling of renal epithelial neoplasms: a method for tumor classification and discovery of diagnostic molecular markers // *Am J Pathol.* 2001. Vol. 158. P. 1639–1651.
28. Kim H. L., Seligson D., Liu X. et al. Using protein expression to predict survival in clear cell renal carcinoma // *Clin Cancer Res.* 2004. Vol. 10. P. 5464–5471.
29. Kim H. L., Seligson D., Liu X. et al. Molecular staging using protein expression profiling in metastatic clear cell renal carcinoma // *J Urol.* 2005. Vol. 173. P. 1496–1501.

Статья поступила в редакцию 20 марта 2012 г.